

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Trámite: 11
Evento: 378
Actuación: 444

Re: PI.-UNIVERSIDAD DE LOS ANDES Y CORPORACIÓN CORPOGEN -
Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "TRANSPÓSÓN
QUE PROMUEVE LA EXPRESIÓN FUNCIONAL DE GENE EN ADNS
EPISOMALES Y UN MÉTODO PARA AUMENTAR LA TRANSCRIPCIÓN DE
ADN EN ANÁLISIS FUNCIONALES DE LIBRERÍAS METAGENÓMICAS".
Expediente número NC2017/0000272.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en línea del 16 de abril de 2018.

2. Con el fin de responder las objeciones expuestas por la Examinadora en su Concepto Técnico correspondiente al Oficio N° **4397** en relación con la Claridad y Concisión del Capítulo Reivindicatorio, la Unidad de Invención y el Nivel Inventivo de la presente invención, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales no sólo se superan completamente dichas objeciones sino que además se establece de manera incontrovertible la patentabilidad de la solicitud en estudio.

3. **CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

3.1. **Modificaciones de la Figura 8.**

Con el propósito de dar mayor claridad a la materia reclamada, es deseo del solicitante presentar una **nueva Figura 8**, que reemplaza la actualmente presentada, con el propósito de **introducir números de referencia** para cada uno de los fragmentos que componen el transposón TnC_T7 de la invención y así superar las objeciones a la claridad presentadas como parte del concepto técnico realizado por ese Despacho.

En conexión con la mencionada **Figura 8 modificada**, me permito resaltar que ésta no constituye de ninguna manera una ampliación al alcance de la solicitud, tal como fue originalmente presentada, toda vez que define claramente el objeto de la presente invención de acuerdo con las enseñanzas de la descripción.

3.2. Modificaciones al Capítulo Reivindicatorio.

Me permito manifestar que es deseo del solicitante presentar un **capítulo reivindicatorio modificado**, que reemplaza al actualmente presentado, con el propósito de superar las objeciones presentadas como parte del concepto técnico realizado por ese Despacho.

En conexión con el mencionado **capítulo reivindicatorio modificado**, me permito resaltar que éste no constituye de ninguna manera una ampliación al alcance de la solicitud, tal como fue originalmente presentada, toda vez que define claramente el objeto de la presente invención de acuerdo con las enseñanzas de la descripción. Dichas modificaciones se exponen a continuación:

- ✓ Se modificaron las **reivindicaciones 1 y 2** para identificar las secuencias de cada uno de los fragmentos del transposón TnC_T7 de la invención. Adicionalmente, se incluyeron los números de referencia de la nueva figura 8, con el fin de clarificar el orden de cada uno de dichos fragmentos dentro del transposón TnC_T7. Dichas modificaciones tienen sustento en el ejemplo 2 de la descripción y la Figura 8.
- ✓ Se modificó la actual reivindicación 4, para hacerla dependiente de la actual reivindicación 5. Dicha modificación tiene sustento en el ejemplo 2 de la solicitud.
- ✓ Se eliminaron las **reivindicaciones 6 y 7**.

De esta forma, **el capítulo reivindicatorio modificado queda constituido por 6 reivindicaciones**, las cuales se refieren de manera más clara y concisa al transposón TnC_T7 de la invención, su método de obtención y su aplicación en el aumento de la transcripción de ADN, que son objeto de la presente solicitud, y que cuentan con pleno sustento en las enseñanzas de la descripción.

3.3. Claridad y Concisión del Capítulo Reivindicatorio.

Con respecto a la claridad y la concisión del capítulo reivindicatorio, el Examinador afirma lo siguiente:

- ✓ *"La reivindicación 1 no es clara ya que se refiere a un transposón que comprende cuatro segmentos estructurales de tipo: marcador de selección, promotor y gen de T7RNA polimerasa, promotores flanqueantes de lectura de T7 y sitios flanqueantes de reconocimiento para la transposasa MuA, donde no todos los segmentos estructurales son descritos por sus correspondientes secuencias de nucleótidos y donde no se menciona su organización en el contexto de dicho transposon. Se*

recuerda al solicitante que una reivindicación independiente debe contener todas las características técnicas esenciales por lo que es imperativo señalar la estructura completa del objeto reivindicado, esto es señalar su secuencia completa de nucleótidos o describir cada uno de sus segmentos estructurales por sus secuencias de ADN mencionando su organización dentro del producto reivindicado de manera que pueda establecerse la estructura funcional de este de acuerdo con lo soportado en el capítulo descriptivo.”

Al respecto, me permito llamar la atención de la examinadora al nuevo pliego reivindicatorio en el cual se han modificado las reivindicaciones 1 y 2 para definir tanto la secuencia como el orden de cada uno de los fragmentos que conforman el transposón TnC_T7 de la invención.

En este sentido, me permito resaltar que las modificaciones realizadas a dichas reivindicaciones se encuentran en concordancia con lo divulgado en las figuras FIG. 7 y FIG. 8, las cuales muestran a escala el orden específico de cada uno de los fragmentos de ADN reclamados en la reivindicación 1.

La **FIG. 7** muestra la estructura del transposón TnC_T7 al estar clonado en el vector pUC57 (forma circular del plásmido). En esta imagen el transposón TnC_T7 se encuentra delimitado por los sitios de restricción BglII. Por su parte, la **FIG. 8** muestra la estructura del transposón y la organización de sus partes de forma lineal. Por lo tanto, se puede deducir que el transposón TnC_T7 empieza con un fragmento de la región Tn_A (que incluye un sitio de unión para la transposasa MuA y un promotor T7), seguido del gen codificante de la T7RNA polimerasa regulado por el promotor inducible P_{BAD}, seguido del gen de resistencia a Kanamicina (en la hebra opuesta de ADN), seguido finalmente por un fragmento de la región Tn_B (que incluye el segundo sitio de unión para la transposasa MuA y el segundo promotor T7).

Las nuevas reivindicaciones 1 y 2 señalan claramente dichas características estructurales, de manera que se ha atendido a la objeción de la examinadora.

- ✓ *"La reivindicación 2 no es clara y no se encuentra sustentada en la descripción, ya que se refiere a un vector artificial que contiene el transposón previamente reclamado, el cual se define por la combinación de una serie de elementos de ADN, sin embargo en el capítulo descriptivo únicamente existe soporte para el desarrollo de ocho plásmidos y un fosmido que comprenden los elementos estructurales señalados en la reivindicación en un orden específico el cual se describe en las figuras 1-9 o mediante las secuencias completas de nucleótidos de cada uno de dichos vectores, por lo que cualquier otra combinación dentro del alcance de la reivindicación no ha sido desarrollada y/o evaluada y por lo tanto no puede*

determinarse alguna funcionalidad asociada a la misma. Se sugiere al solicitante relacionar en la reivindicación las combinaciones específicas mediante la referencia de las estructuras completas de los constructos desarrollados de manera que se encuentren debidamente soportadas.”

Al respecto, me permito aclarar que la reivindicación 2 se refiere a un vector artificial que contiene el transposón de la invención tal como se muestra en la FIG. 7. En este sentido, se ha modificado dicha reivindicación para definir la estructura el transposón insertado de acuerdo con las modificaciones realizadas sobre la reivindicación 1. De manera que amablemente solicito a la examinadora reconsiderar su objeción.

- ✓ *"La reivindicación 4 no es clara ya que se refiere a una secuencia artificial de ADN que comprende tres regiones estructurales, las cuales no son referenciadas por sus secuencias de nucleótidos. Se recuerda al solicitante que una molécula de ADN debe caracterizarse por su estructura la cual comprende su secuencia completa de nucleótidos, ya que la mera mención de los segmentos componentes, pese a que hagan parte del lenguaje común en el campo técnico, no permite llegar a la estructura del objeto reivindicado ya que no se señala en la reivindicación la organización de estos elementos dentro de la molécula reclamada, por lo que no puede establecerse una función asociada a las posibles estructuras resultantes, ni tampoco es posible distinguir las estructuras incluidas en el alcance de la reivindicación de cualquier otra alternativa del estado de la técnica.*

Al respecto, me permito llamar la atención de la examinadora al nuevo pliego reivindicatorio en el cual se ha modificado la actual reivindicación 4 (nueva reivindicación 5) para hacerla dependiente de la actual reivindicación 5 (nueva reivindicación 4), y clarificar de esta manera que la secuencia de ADN artificial reclamada corresponde al primer constructo necesario para el método de obtención del transposón TnC_T7 de la invención.

Adicionalmente, me permito señalar que la nueva reivindicación 5 define que la secuencia de ADN artificial allí reclamada comprende la SEQ ID NO: 3, de manera que su estructura completa se encuentra definida.

De esta manera, amablemente solicito a la examinadora reconsiderar la citada objeción.

- ✓ *"La reivindicación 6 no es clara ya que se refiere a un vector de expresión el cual se define como resultante de la inserción aleatoria del transposón, el cual comprende una región fija denominada esqueleto con la SEQ ID NO: 14 y una región que se define como de "inserción diferencial del transposón", la cual menciona que el*

transposón se inserta a lo largo del esqueleto descrito previamente o de la SEQ ID NO: 14, por lo que se está definiendo dos partes estructurales del mismo vector a través de las mismas características técnicas. Se sugiere redefinir la reivindicación para establecer la estructura clara del vector reivindicado, para esto es aconsejable incluir las secuencias de los vectores resultantes de los eventos de transposición señaladas en la descripción y evitar la ambigüedad de la reivindicación como se presenta.”

Al respecto, me permito señalar que dicha reivindicación fue eliminada del nuevo pliego reivindicatorio, por lo que tal objeción se ha superado.

Con base en los argumentos anteriormente proporcionados, me permito señalar que el capítulo reivindicatorio modificado presentado junto con el este memorial supera completamente las objeciones de claridad y concisión de la Señora Examinadora y, por ende, cumple a cabalidad con lo estipulado por el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

4. UNIDAD DE INVENCION.

La Señora Examinadora objeta la unidad de invención de la presente solicitud, señalando que existen los siguientes 3 grupos inventivos en la materia reclamada:

- ✓ Grupo I: Reivindicaciones 1-5, 7 y 8. Transposón para suministrar parcialmente la maquinaria transcripcional del hospedero durante análisis funcionales de librerías genómicas/metagenómicas que comprende: marcador de resistencia a la kanamicina (SEQID NO: 5), T7RNA polimerasa bajo promotor inducible de arabinosa (SEQ ID NO: 8), dos promotores T7 flanqueantes de lectura hacia el exterior y dos sitios flanqueantes de reconocimiento de repetición invertida para la transposasa MuA adyacentes a cada promotor individual T7, vectores que comprenden el transposón descrito, una secuencia artificial de ADN para localizar el sitio de unión a MuA y un sitio de promotor T7 (SEQ D NO: 3), métodos para la construcción del transposón y para aumentar la transcripción de ADN foráneo.
- ✓ Grupo II: Reivindicaciones 6 y 8. Vector artificial SEQ ID NO: 15, resultado de la inserción aleatoria del transposón a lo largo de la secuencia de ADN del fósido PCC2FOS_F076, y un método para incrementar la transcripción de un ADN foráneo
- ✓ Grupo III: Reivindicaciones 6 y 8. Vector artificial resultado de la inserción aleatoria del transposón que comprende una inserción diferencial el transposón a lo largo de la secuencia de ADN SEQ ID NO: 14, y un método para incrementar la transcripción de un ADN foráneo.

En este sentido, me permito llamar la atención de la examinadora sobre el nuevo pliego reivindicatorio del cual **se han eliminado las reivindicaciones 6 y 7**, de manera que dicho pliego reivindicatorio se refiere ahora a un único concepto inventivo de acuerdo con el Grupo I señalado por la examinadora. Por lo tanto, el nuevo capítulo reivindicatorio cumple a cabalidad con el requerimiento de unidad de invención.

5. **NIVEL INVENTIVO.**

Finalmente, la señora Examinadora considera que la materia reclamada en la reivindicación 1 actualmente presentada y sus dependientes 2 y 3 carecerían de altura inventiva con respecto a las enseñanzas de los documentos **D1 (A novel transposon for functional expression of DNA libraries¹)** y **D2 (One step engineering of T7-expression strains for protein production: Increasing the host-range of the T7-expression system²)**.

En conexión con lo anterior, la Examinadora inicialmente afirma que el documento D1 es el estado de la técnica más cercano a la invención definida en las reivindicaciones 1 a 3 ya que divulga un transposon MuExpress que se incorpora aleatoriamente en insertos grandes o pequeños de librerías y eleva el nivel de transcripción en ambas direcciones (Pág. 282, Líneas 20-23) que comprende: casetes de resistencia a los antibióticos cloranfenicol o kanamicina, (Pág. 283, Fig. 1), dos promotores T7 flanqueantes que promueven la transcripción en ambas direcciones (Pág. 283, Fig. 1), dos sitios de repetición invertida (IR) de unión para la transposasa Mu (Pág. 283, Fig. 1) y en donde dicho constructo se vale de la ARN polimerasa T7 expresada induciblemente con IPTG a partir del genoma de la bacteria E. coli BL21 (DE3) (Pág. 282, Col. Der, Líneas 4-7).

En este sentido, la Examinadora indica que la diferencia entre la invención definida en las reivindicaciones 1 a 3 y el documento D1 consiste en que el transposón de la solicitud comprende además una secuencia génica para la ARN polimerasa derivada del fago T7 que se encuentra bajo el promotor inducible por arabinosa derivado del plásmido pBAD18-Cm (SEQ ID NO: 8).

Por otro lado, la Examinadora afirma que D2 divulga el gen codificante de la gentamicina acetiltransferasa y el gen codificante para la beta-lactamasa, el promotor LacUV5, el gen codificante para la T7 ARN polimerasa y dos sitios flanqueantes de repeticiones invertidas mariner de 28pb reconocidas por transposasas (Fig. 1, Pág. 9), los depósitos de las respectivas secuencias de dichos vectores en el GenBank con los

¹ “A novel transposon for functional expression of DNA libraries”, Christian Leggewie, et al., Journal of Biotechnology 123 (2006) 281–287.

números de acceso EF153730, EF153731 y EF153732 (Fig. 1, Pág. 9), y menciona que dichos transposones pueden ser introducidos en cromosomas bacterianos y tiene ejemplos de la incorporación en seis diferentes especies de Proteobacterias (Pág. 5, Párr. 6).

En consecuencia, la examinadora afirma que la persona versada en la materia combinaría la secuencia génica codificante de la T7 RNA polimerasa del transposón del documento D2, en un transposón como el divulgado en el documento D1, para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

En vista de las objeciones anteriormente citadas, me permito mencionar que, contrario a lo que afirma la Examinadora, una persona normalmente versada en la materia no consideraría que las enseñanzas de los documentos D1 y D2 anticipan el transposon tal como se describe en la presente invención. Para sustentar la anterior afirmación me permito presentar los siguientes argumentos:

✓ **Existe más de una diferencia entre el transposon y el vector de la invención y el transposon divulgado en el documento D1**

Me permito señalar que la inclusión del gen codificante de la T7RNA polimerasa **dentro de la estructura del transposón** (de forma específica tanto en posición como en orientación) permite la utilización del sistema de transposición de la invención en células bacterianas que no expresan dicha enzima polimerasa, tal como lo es la cepa EPI300 de E. coli. En el caso del documento D1 citado, **la T7RNA polimerasa es expresada desde el genoma de una cepa bacteriana distinta, la E. coli BL-21**. Esto impone diferencias cruciales en la estructura e implementación del transposón TnC_T7 con relación a la herramienta divulgada en el documento D1.

En primer lugar, es pertinente señalar que el transposón divulgado en el documento D1 solo puede ser empleado de forma eficiente en cepas bacterianas que expresen induciblemente desde el genoma la T7RNA polimerasa, como es el caso de la cepa BL-21 de E. coli. Como se mencionó, el transposón TnC_T7 incluye por sí mismo el gen codificante de la T7RNA polimerasa, lo cual permite ampliar el rango de hospedero en el cual pueda ser usado, además de encontrarse regulado a nivel episomal (extracromosomal). Esto quiere decir que una vez que el transposón TnC_T7 se inserte en algún clon metagenómico, tendrá inherentemente toda la capacidad de promover la expresión funcional de genes, **de forma independiente a las características del hospedero bacteriano que lo contenga**.

² “One step engineering of T7-expression strains for protein production: Increasing the host-range of the T7-expression system” Yun Kang, et al., Protein Expr Purif. 2007 October; 55(2): 325–333

Por otra parte, me permito señalar que el transposón divulgado en el documento D1 incluye dos regiones lac op. (operadores *lac*) adyacentes a cada uno de los promotores bidireccionales T7. **Estas regiones no fueron incluidas en el transposón TnC_T7 de la invención**, ya que dichas dos regiones lac op. permiten realizar una regulación de la transcripción desde los promotores T7 cuando la inducción de la polimerasa se realiza con compuestos análogos a la lactosa, como lo es el IPTG (represión por catabolito del operon lac como se discute en el ANEXO 1). En nuestro caso, el **sistema de represión/inducción de la T7RNA polimerasa desde el transposón TnC_T7 consistió en una regulación por el promotor inducible de arabinosa (P_{BAD})**, razón por la cual se obviaron las regiones lac op.

Por otra parte, un análisis exhaustivo de la metodología expuesta en el documento D1 revela que una de las dos regiones promotoras T7 del transposón no es funcional, es decir que nunca va a ser reconocida por la T7RNA polimerasa expresada desde el genoma bacteriano. Esto se puede deducir a partir de las secuencias artificiales empleadas por los autores (páginas 282 y 283) para la construcción de dicho transposón. Por lo tanto, para el diseño del transposón TnC_T7 y de cada una de sus partes se empleó un método exhaustivo que permitió asegurar el correcto funcionamiento independiente de los promotores T7, así como de las regiones de reconocimiento de la transposasa MuA en la versión final del transposón TnC_T7. Por lo tanto, es acertado afirmar que **se realizaron cambios significativos sobre las regiones de ADN que comprenden los promotores T7 y los sitios de reconocimiento de la transposasa MuA (en nuestro caso serían las secuencias Tn_A y Tn_B) en comparación con la información contenida en el documento D1** y que en ningún caso se emplearon ni siquiera parcialmente las secuencias génicas divulgadas en dicho documento.

✓ **Existe un efecto técnico inesperado asociado a las diferencias entre el documento D1 y el transposón de la solicitud**

En este sentido, me permito resaltar que el sistema de regulación en la expresión de la T7RNA polimerasa desde el transposón TnC_T7, al estar regulado por un promotor P_{BAD} es aún más compatible con la cepa bacteriana en la que normalmente se construyen las librerías metagenómicas: E. coli EPI300. Dicha cepa contiene una modificación genómica que le permite aumentar el número de copias del material genético extracromosomal que alberga el ADN metagenómico (ver ANEXO 2). Por lo tanto, un evento de inducción con arabinosa en un clon metagenómico en esta bacteria promueve eficientemente tanto la expresión de la T7RNA polimerasa, como la expresión de los genes foráneos albergados en múltiples copias del ADN metagenómico. Estas dos características hacen única la eficiencia del transposón TnC_T7 para favorecer la expresión funcional de genes en librerías genómicas y metagenómicas.

- ✓ **El documento D2 no proporciona motivación suficiente para superar las diferencias entre el transposón del documento D1 y el de la invención.**

Me permito señalar que el documento D2 divulga una herramienta y un método para generar líneas celulares bacterianas genéticamente modificadas que expresen la enzima T7RNA polimerasa desde sus respectivos genomas. En el caso particular del documento D2, dicha estrategia fue basada en usar **un transposón tipo mariner (Tn5) que tuviera la capacidad de integrar todo un constructo genético de forma aleatoria específicamente sobre el genoma de una bacteria seleccionada.**

Por lo tanto, a partir de la divulgación del documento D2 no resultaría evidente para la persona normalmente versada en la invención diseñar un transposón como el de la presente invención, ya que dicho documento **no sugiere la inserción de un transposón en material genético extracromosomal**, como los son plásmidos, fósmidos o cósmidos, siendo esta una de las capacidades descritas para el transposón TnC_T7 de la invención.

Adicionalmente, tanto el documento D1 y como el documento D2 abordan la expresión de la T7RNA polimerasa a partir de un promotor inducible con lactosa o análogos (promotores lac y LacUV5), mientras que en el transposón TnC_T7 de la invención el gen codificante de dicha enzima está regulado desde un promotor P_{BAD}. Esta modificación, no resultaría evidente para la persona normalmente versada en la materia, puesto que tiene unas connotaciones funcionales particulares para librerías metagenómicas construidas y almacenadas en bacterias como la E. coli EPI300, tal como se explicó antes.

Adicionalmente, a partir de las divulgaciones de los documentos citados, es claro que para la persona normalmente versada en la materia no resultaría obvia la estructura final del transposón TnC_T7 de la invención (FIG. 8), ya que dichos documentos no mencionan todas y cada una de sus partes, ni el orden específico ni en su orientación de las mismas en el transposón TnC_T7. Tal como se explica en este memorial, dicha estructura final del transposón TnC_T7 de la invención como herramienta genética tiene un efecto profundo en la funcionalidad validada y reclamada en la patente.

Consideraciones finales:

Con base en los argumentos anteriormente proporcionados, es evidente que **ninguno de los documentos D1 o D2, por separado o en combinación, conducirían a la persona versada en la materia a obtener el transposón TnC_T7, tal como se reclama en el capítulo reivindicatorio aquí presentado**, y por lo tanto de ninguna manera puede afectar el nivel inventivo de la solicitud.

En consecuencia, amablemente me permito manifestar ante ese Despacho que la materia del capítulo reivindicatorio modificado presenta un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas de los documentos D1 y D2, cumpliendo por lo tanto a cabalidad con los requisitos de patentabilidad establecidos en el Artículo 18 de la Decisión Andina 486/2000.

6. **CONCLUSIÓN.**

Para finalizar, me permito reiterar que el capítulo reivindicatorio modificado presentado junto con este memorial es totalmente claro y conciso al reclamar el transposón TnC_T7 y su método de obtención, que están plenamente soportados dentro del texto de la descripción, cumpliendo así con lo exigido por la mencionada Decisión Andina 486 de 2000.

Por otro lado, en virtud de los argumentos discutidos con respecto a los documentos citados, se estableció de manera incontrovertible que el transposón TnC_T7 y su método de obtención que son objeto de la solicitud en estudio son novedosos y de ninguna manera resultarían evidentes para la persona versada en la materia a partir de las enseñanzas de los documentos referenciados, demostrando irrefutablemente la patentabilidad de la presente solicitud.

7. Anexo al presente memorial, me permito presentar:

- Copia de la **Figura 8 modificada.**
- Copia de las páginas **28 a 32** que corresponden al **capítulo reivindicatorio modificado**, tal como se discutió en el presente memorial, constituido por **6 reivindicaciones.**
- Anexo 1.
- Anexo 2.

8. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,



ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P. 53.215

Direcciones para Notificación: **notificacionesip@lloredacamacho.com**

notificacionespatentes@lloredacamacho.com